

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 760 025**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)
(21) N° d'enregistrement national : **97 02093**

(51) Int Cl⁶ : C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 21.02.97.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 28.08.98 Bulletin 98/35.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

(72) Inventeur(s) : EGLY JEAN MARC, COIN FREDERIC, MORAS DINO et RENAUD JEAN PAUL.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) **PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE ET/OU DE DOSAGE D'ADN ENDOMMAGE DANS UN ECHANTILLON D'ADN ET SON APPLICATION AU CRIBLAGE DE PRODUITS CYTOTOXIQUES AGISSANT SUR L'ADN.**

(57) La présente invention concerne un procédé de mise en évidence et/ ou de dosage d'ADN endommagé dans un échantillon, caractérisé en ce qu'on évalue l'importance de la fixation de TBP ou d'un produit analogue sur l'ADN de l'échantillon et on détermine les résultats directement ou par rapport à un témoin. Ce procédé peut être utilisé pour le criblage de produits cytotoxiques agissant sur l'ADN.

FR 2 760 025 - A1



PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE ET/OU DE DOSAGE D'ADN
ENDOMMAGE DANS UN ECHANTILLON D'ADN ET SON APPLICATION AU
CRIBLAGE DE PRODUITS CYTOTOXIQUES AGISSANT SUR L'ADN

5 La présente invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou dosage de la présence d'ADN endommagé dans un échantillon d'ADN et son application à l'identification et/ou au criblage de produits susceptibles d'endommager l'ADN.

10 Les agressions d'origine extérieure que subit l'ADN peuvent être variées. Elles sont en général regroupées en deux catégories :
- les agressions d'origine physique produites notamment par les rayonnements, et ;
- les agressions d'origine chimique.

15 Il convient dès à présent de rappeler que l'endommagement de l'ADN est un phénomène qui intervient notamment dans les traitements anticancéreux.

20 Ainsi par exemple, le médicament anticancéreux cisplatine étant considéré comme faisant partie des agents endommageant l'ADN (Zamble et Lippard, 1995), son utilisation dans les traitements de certains cancers est essentielle. C'est pourquoi dans ce qui va suivre, l'évaluation de l'endommagement de l'ADN pourra aussi bien permettre de mettre en évidence la toxicité d'un agent d'agression que de suivre l'évolution d'une thérapie, anticancéreuse notamment.

25 La réponse apportée par les cellules à ces agressions d'origines diverses qui conduisent à l'endommagement de l'ADN, se traduit par la mise en place du mécanisme dit de réparation de l'ADN.

30 Ce mécanisme de réparation très complexe met en œuvre un certain nombre de protéines, certaines d'entre elles étant également impliquées dans des processus cellulaires autres que la réparation.

Ainsi, la possibilité d'un lien entre les mécanismes de transcription de gènes codant pour les protéines et ceux impliqués dans la réparation de l'ADN a été évoquée (Friedberg, 1996). Plus précisément, le facteur de transcription TFIIH est considéré comme étant essentiel à la fois pour la transcription et pour le mécanisme de réparation de l'ADN par excision (Svejstrup et al.;, 1996, Hoeijmakers et al., 1996).

Toutefois l'importance, dans le mécanisme de reconnaissance d'une lésion à l'ADN, d'une protéine connue pour son activité au niveau de la transcription, dénommée TBP pour "TATA binding protein", n'avait jamais été suggérée et c'est précisément cette constatation qui a permis de développer les procédés de dosage, objet de la présente invention.

En effet, on a pu mettre en évidence qu'en cas d'endommagement de l'ADN, d'une part le TBP se lie à l'ADN endommagé pour former un complexe qui peut être identifié et dosé, et d'autre part que la fixation de ce TBP sur l'ADN endommagé constitue un facteur limitant pour la transcription spécifique d'un ADN non endommagé contenant un promoteur. Ainsi, pour évaluer l'endommagement de l'ADN, on peut mettre à profit la fixation du TBP sur l'ADN endommagé et par la même le déficit de TBP dans le milieu, par la diminution de la transcription d'un ADN non endommagé.

C'est pourquoi, la présente invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou de dosage d'ADN endommagé dans un échantillon, caractérisé en ce qu'on évalue l'importance de la fixation de TBP ou d'un produit analogue sur l'ADN de l'échantillon et on détermine les résultats directement ou par rapport à un témoin.

Par TBP, on entend aussi bien le TBP sous forme libre, par exemple une protéine purifiée recombinante que sous sa forme complexée, par exemple le complexe TFIID, dont TBP est un des composants.

D'une manière générale, on peut aussi envisager d'utiliser un produit analogue au TBP qui conserve sa capacité à fixer l'ADN endommagé.

5 Par dosage, on entend aussi bien un dosage qualitatif que quantitatif.

Par évaluation, on entend déterminer la fixation ou la non fixation du TBP, laquelle est faite directement si on dispose par exemple de courbes 10 d'étalonnage, ou bien par comparaison avec un témoin correspondant à des ADN non endommagés ou ADN endommagés témoins. Comme cela sera démontré ci-après, le complexe ADN endommagé/TBP est suffisamment stable pour être identifié et dosé et l'importance de la fixation de TBP est un bon indice de l'importance du dommage causé à l'ADN.

15 Par importance, on entend désigner aussi bien la qualité ou le type de dommages que leur nombre, voire même l'emplacement de ces dommages.

20 La mise en évidence ou le dosage peuvent être effectués soit directement soit indirectement.

Dans le premier cas, on utilise comme élément à doser, le complexe formé lui-même, dans le second cas, on utilise le fait que lorsqu'il est 25 engagé dans le complexe TBP/ADN endommagé, le TBP n'est plus disponible pour assurer l'initiation de la transcription d'un second ADN non endommagé. Il y a donc une diminution de la transcription qui est proportionnelle à la quantité de TBP fixé sur l'ADN endommagé et donc au dommage de l'ADN.

30 Ainsi, dans un premier mode de réalisation, la présente invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou de dosage d'ADN endommagé dans un échantillon caractérisé en ce que l'importance de la fixation du TBP sur l'ADN est évaluée par détermination de la transcription

d'un ADN non endommagé connu, dans des conditions permettant une transcription spécifique, la transcription n'étant assurée que par la présence dans ledit milieu de TBP résiduel non fixé sur l'ADN.

5 Comme cela a été précisé précédemment, le TBP étant fixé à l'ADN endommagé, il n'est pas disponible pour assurer la transcription de l'ADN non endommagé.

10 La mesure de la transcription, et donc de l'ARN transcrit correspondant à l'ADN non endommagé, peut être effectuée par toutes méthodes connues, migration sur gel par exemple, comme cela sera expliqué plus en détails dans les exemples ci-après.

15 De préférence, le procédé est mis en oeuvre de la façon suivante :

- 15 a) l'échantillon est mis en incubation dans un milieu contenant l'ensemble des composants nécessaires à la transcription spécifique, dont TBP ou un produit analogue ;
- 20 b) après incubation, on ajoute à l'échantillon une séquence d'ADN non endommagé connu contenant un promoteur, dans des conditions assurant la transcription mais sans TBP additionnel ;
- 25 c) on détermine la transcription de cet ADN connu et ;
- d) on mesure la variation de transcription de cet ADN connu par rapport à une transcription normale ou par comparaison avec un témoin.

30 De façon générale, l'étape a) est effectuée dans des conditions qui ne permettent pas la réparation de l'ADN et l'étape b) est effectuée dans un milieu qui contient l'ensemble des facteurs de transcription. Un tel milieu peut être constitué d'extraits cellulaires totaux, extraits de cellules HeLa par exemple, ou encore d'un système de transcription reconstitué.

Dans un second mode de réalisation du procédé selon l'invention, on met en évidence et/ou on dose la présence d'ADN endommagé dans un échantillon par un procédé dans lequel ledit échantillon est mis en présence d'un réactif contenant du TBP ou un produit analogue et on 5 évalue l'importance du dommage de l'ADN par mise en évidence et/ou dosage du complexe TBP/ADN formé, directement ou par rapport à un témoin.

Le complexe TBP/ADN peut être mis en évidence et/ou dosé par toute 10 méthode appropriée.

On peut tout d'abord évaluer et doser le complexe lui-même, par exemple en le fixant sur un support présentant une affinité pour les protéines. Il peut s'agir notamment d'une membrane de nitrocellulose et 15 on mesurera alors la quantité d'ADN retenue sur la membrane.

On peut également mettre à profit les propriétés particulières du complexe formé. Par exemple, on peut mesurer la variation de mobilité électrophorétique du complexe sur un gel, gel d'acrylamide par exemple. 20

Enfin, on peut envisager d'évaluer la formation du complexe par la technique d'empreinte à la DNase I.

On peut bien entendu effectuer un dosage du TBP libre restant, 25 lorsque l'on connaît la quantité de TBP introduite à l'origine, le TBP libre peut être dosé par toute méthode connue pour doser les protéines, méthode ELISA par exemple.

La comparaison de la structure ADN contenant une séquence TATA 30 interagissant avec TBP et celle établie à partir d'ADN endommagé par le cisplatine ou endommagé aux UV, permet de conclure à une analogie structurelle de ces différents ADN reconnus de ce fait par le TBP.

En effet, en raison des lésions, l'ADN adopte une structure courbée qui présente des similitudes avec la forme A de l'ADN. L'élargissement et l'aplatissement du petit sillon qui en résulte, permettent des contacts hydrophobes et favorisent la formation du complexe TBP/ADN endommagé.

5

L'analogie a ainsi permis de démontrer que des fragments d'ADN contenant une séquence "TATA" étaient susceptibles d'entrer en compétition avec l'ADN endommagé lors de la formation du complexe.

10

Il est ainsi possible de prévoir des dosages par compétition.

15

Les procédés selon la présente invention permettent de mettre non seulement en évidence l'endommagement de l'ADN marqué, mais également son dosage semi-quantitatif ou quantitatif, par exemple en comparant la capacité d'inhibition de la transcription d'un ADN non endommagé à celle d'un ADN endommagé préalablement identifié.

20

Notamment l'utilisation de réactifs radioactifs ou non, par exemple fluorescents, permet par mesure d'une intensité de bande de faire un dosage quantitatif de la formation de complexes TBP/ADN.

25

L'intérêt de ces dosages est tout d'abord, au stade de la recherche industrielle, de permettre la recherche et l'identification de produits cytotoxiques ayant un mode d'action particulier de type "cisplatine". Ainsi pourra-t-on évaluer les capacités mutagènes d'un produit donné.

30

Ainsi, le procédé selon la présente invention peut être utilisé comme un procédé de criblage de produits cytotoxiques agissant sur l'ADN, notamment les anticancéreux, ceux-ci étant révélés soit par la formation du complexe TBP/ADN, soit par la diminution de la transcription d'un ADN qui n'a pas été endommagé.

Les procédés selon la présente invention peuvent également être utilisés pour tester la toxicité éventuelle de certains produits, cosmétiques, herbicides, pharmaceutiques, par exemple par des prélèvements réguliers dans des enceintes industrielles à risque.

5

Le procédé selon la présente invention peut également être utilisé pour le suivi thérapeutique, notamment dans les thérapies anticancéreuses.

10

Plus précisément, pour déterminer la cytotoxicité sur l'ADN d'un produit donné, on fait réagir au préalable ledit produit dans un échantillon d'ADN non endommagé, ledit échantillon étant alors dépourvu de tous autres produits susceptibles d'endommager l'ADN et on procède selon les différentes variantes envisagées selon l'invention, la cytotoxicité du produit étant établie lorsque de l'ADN endommagé est détecté.

La présente invention sera illustrée par les exemples suivants accompagnées des figures 1 à 7, lesquels représentent :

20

Figure 1 :

Partie (A) : Schématise une expérience de compétition / transcription.

25

Partie (B) : Schématise la structure de différents fragments d'ADN utilisés pour l'expérience de compétition / transcription in vitro. Une matrice de transcription AdMLP est générée par digestion/restriction avec EcoRI/Sall du plasmide pUC309. Suite à sa transcription, elle donne naissance à un transcript d'ARN de 309 nucléotides (partie hachurée). Le fragment F879 est créé par digestion/restriction de pUC309 avec BamHI et Sspl. Ce fragment ne contient aucune séquence promotrice.

35

Figure 2 (A à C) : Représente les résultats obtenus lors d'expériences d'inhibition de la transcription in vitro à partir de AdMLP en présence d'ADN endommagé par les UV, par le cisplatine ou par l'acétylaminofluorène (AAF).

Figure 3 (A à E) : Représente des dosages réalisés en utilisant la fixation du complexe sur une membrane de cellulose et les réactions de compétition-transcription de l'ADN.

5 **Figure 4** : Représente la mise en évidence du complexe TBP/ADN endommagé par la technique EMSA..

10 Les expériences suivantes ont été réalisées pour mettre en évidence la capacité du TBP à interagir avec de l'ADN endommagé.

10

MATERIELS ET METHODES

15 On utilise des extraits cellulaires totaux (WCE) HeLa ainsi que les composants du système de transcription reconstitué *in vitro* tel que décrit dans Humbert et al. (1994).

20 Les substrats ADN utilisés pour la transcription *in vitro* ou pour le test de fixation sur membrane sont préparés par digestion/restriction soit d'ADN plasmidique de pUC309 soit de pSK (commercialisé par STRATAGENE). Le plasmide pUC309 est préparé par ligation d'un fragment EcoRI/BamHI correspondant aux séquences -372 à +33 du promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 (AdMLP), au fragment BamHI/Sall de pBR322. Le fragment résultant est cloné dans les sites EcoRI/Sall de pUC19 pour former le plasmide pUC309. Le fragment d'ADN compétiteur de 879 pb (F879) est préparé par digestion/restriction de pUC309 avec BamHI/SspI (Figure 1B). Les fragments linéarisés sont purifiés sur gel d'agarose à 1% et billes Qjaex (Société Qjagen), puis resuspendus dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), contenant 10 % de glycerol, 1mM d'EDTA, 0,5 mM de DTT et 50 mM de KCl pour utilisation ultérieure, dans les expériences de transcription ou de mise en évidence de complexe Protéine/ADN (EMSA ; rétention sur membrane). Le compétiteur final utilisé était le "Bluescript"™ de 3 kb, plasmide pSK (Stratagene). Le fragment F879 a été endommagé aux UV avec une lampe UV-C à une puissance de 0.1 mW/cm². Le plasmide pSK est traité avec une solution de 0.1 mg/ml dans l'eau de cis-diamino

dichloroplatine (Sigma) pendant 15 heures dans l'obscurité à 37°C et avec un rapport cisplatine/nucléotide de 0.005 (Hansson and Wood, 1989). Le plasmide pSK a été également traité avec 0.1 mM de N-acetoxy-2-acetylaminofluorène induisant principalement des adduits N-(guanine-8-yl)-acetylaminofluorène (AAF).

On génère les fragments CP(-) ou CP(+) utilisés ultérieurement dans les tests de fixation sur membrane par digestion/restriction de pSK, respectivement intacts ou endommagés par le cisplatine, avec l'enzyme de restriction Pvul suivie d'une purification du fragment de 1084 pb sur des gels d'agarose 1%.

Pour la technique de migration sur gel (EMSA), on prépare une sonde ne contenant qu'un seul site endommagé. Une sonde de séquence 15 5'-TCTTCITCTTCTTCTGTGCACTCTTCTTCT-3' (32pb) contenant un seul GpTpG est mise en contact avec une solution de cis-diamino dichloroplatine (Sigma) (Moggs et al. 1996). Après précipitation à l'éthanol, la présence d'une liaison 1,3-cisplatine d(GpTpG) a été confirmée par analyse de l'oligonucléotide sur un gel d'acrylamide à 12 %, l'oligonucléotide modifié 20 migrant plus lentement que l'oligonucléotide intact.

La sonde d'ADN résultante (36 pb) utilisée dans le test EMSA est préparée en appariant l'oligonucléotide cisplatiné avec son oligonucléotide complémentaire non endommagé laissant une partie 5' 25 libre à chaque extrémité.

L'ADN est marqué radioactivement avec du dATP α p32 (3000 Ci/mmol) à l'aide du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E.coli puis purifié sur colonnes sephadex G50.

30 Pour la technique EMSA, on prépare des milieux de réaction (20 μ l) contenant un tampon 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 0.2 ng de la sonde d'ADN cisplatinée de 36 pb marquée au p32 (10000 cpm), 80 mM de KCl, 5 mM de

MgCl₂, 0.1 mM de EDTA, 500 ng de BSA, 10% de glycérol, 0,5 mM de DTT, 0.01 % NP40, 10 ng de TBP recombinant. Après 30 minutes d'incubation à 25°C, les échantillons sont ajustés à 20 % de glycérol et déposés sur gel de polyacrylamide à 4 %. La migration électrophorétique se fait dans un tampon 25 mM Tris/19 mM Glycine à température ambiante. Les gels sont séchés et exposés aux films biomax (Kodak).

Un ADN compétiteur (AdMLP - 64 pb) a été préparé à partir d'oligonucléotides complémentaires synthétisés correspondant aux régions -40 à +24 du promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 (AdMLP).

EXEMPLE 1 : Procédé utilisant le "défaut de transcription" du à la formation du complexe TBP/ADN (Fig. 2).

On incube 20-30 µg d'extraits cellulaires totaux préparés à partir de cellules HeLa avec des quantités croissantes d'ADN endommagé (matrice compétiteur) dans un tampon 50 mM Tris/HCl pH 7.9 contenant 10 % de glycerol, 1mM de EDTA, 0,5 mM de DTT, et 5 mM de MgCl₂ pendant 15 min à 25°C (volume final des produits réactionnels = 20 µl) afin de permettre la fixation de TBP/TFIID.

On ajoute ensuite 90 ng de la matrice AdMLP (EcoRI/Sall) devant donner naissance à un transcript spécifique que l'on laisse incuber pendant 15 minutes pour favoriser la formation du complexe de préinitiation de la transcription. Suite à l'addition de nucléotides triphosphate ATP, GTP, UTP, y compris p32 CTP (400Ci/mmol), (volume final de réaction de 25 µl), la transcription démarre et se poursuit pendant 45 min à 25°C. La réaction est stoppée par addition d'une solution contenant du sodium docecy1 sulfate à 10 % (poids/volume), les ARN transcrits sont analysés après électrophorèse sur gel 5% acrylamide, par autoradiographie puis quantifiés directement par comptage sur un Analyseur Phospholimage ou indirectement par balayage densitométrique des autoradiogrammes en utilisant un densitomètre à image BioRad GS700.

Les résultats de ce dosage sont représentés Figure 2.

5 Partie (A) : Les résultats de la transcription de l'AdMLP réalisée avec 30 µg de WCE en présence de quantités croissantes du fragment d'ADN F879 irradié aux UV (650 J/m²) (colonnes 3-8) ou non irradiés (colonnes 9-14). La partie supérieure de la figure représente un autoradiogramme, la partie inférieure représente la quantification densitométrique de l'autoradiogramme (bande de 309 nucléotides) : le pourcentage de transcription à partir de AdMLP est exprimé en fonction de la quantité 10 d'ADN F879 compétiteur exprimée en ng.

15 Partie (B) : Les résultats de la transcription de AdMLP réalisée avec 20 µg de WCE en présence de quantités croissantes de pSK non endommagé (CP(-)) (colonnes 2-8) ou endommagées par le cisplatine (CP(+)) (colonnes 9-15). La partie supérieure de la figure représente la production de transcripts à partir de l'AdMLP (bande de 309 nucléotides). La partie inférieure de la figure représente le même type de quantification densitométrique (voir panneau bas de la Figure 2A).

20 Partie (C) : Les résultats de la transcription de l'AdMLP réalisée avec 20 µg de WCE en présence de quantités croissantes d'ADN pSK linéarisé (EcoRI) non endommagé (AAF-) ou endommagé (AAF+) par l'acétylaminofluorène. Cette expérience est réalisée comme indiqué pour les résultats décrits en A et B.

25 Cet exemple montre clairement le piégeage par l'ADN endommagé suite à une irradiation aux UV (UV(+)) ou à un traitement au cisplatine (CP(+)) ou à l'AAF de facteurs, qui de ce fait ne seront plus disponibles pour la réaction de transcription. La synthèse de transcripts diminue 30 proportionnellement à la quantité d'ADN endommagé ajoutée. On constate également qu'il est possible de quantifier grâce à la transcription, la nature et le nombre des lésions.

La pré-incubation des extraits cellulaires totaux (WCE) avec le fragment de 879 paires de bases irradié aux UV F879 UV(+) (Figure 1B) conduit à une inhibition de la transcription de la matrice AdMLP qui est quatre fois supérieure à celle observée lorsque l'ADN est intact (Figure 2A, 5 comparer les colonnes 3-8 avec les colonnes 9-14 et voir la partie inférieure de la figure). De la même façon, la pré-incubation du plasmide pSK de 3kb contenant environ 30 sites cisplatinés (Hannon et al. 1989) inhibe la transcription environ trois fois plus qu'en présence d'ADN intact (Figure 2B, comparer les colonnes 2-8 aux colonnes 9-15 et voir la partie 10 inférieure de la figure).

Afin de confirmer que l'inhibition de la transcription, (mesurée par la production du transcrit de 309 nucléotides) était bien liée à l'effet de l'ADN endommagé sur des facteurs nécessaires à la transcription, une 15 concentration fixe d'ADN compétiteur a été ajoutée dans le milieu réactionnel tout en faisant varier le rapport fragment endommagé/fragment intact. Dans ces conditions, on a observé une inhibition de la transcription qui augmente avec la quantité de fragments d'ADN endommagé présents dans le milieu réactionnel (Figure 2A, 20 colonnes 15-20).

EXEMPLE 2 : Diminution de la transcription dans un système de transcription reconstitué (RTS) (Fig. 3B et D).

25 Dans cet exemple on utilise un système de transcription reconstitué hautement purifié (RTS), qui contient les facteurs de transcription, TFIIA, TFIIB, le complexe TFIID/TBP, TFIIE, TFIIF et l'ARN pol II. Les facteurs essentiels à la transcription ainsi que l'ARN pol II sont pré-incubés avec l'ADN F879 endommagé par irradiation avec 500 (col. 6 à 9) ou 1000 (col. 10 à 13) J/m², ce dernier étant testé pour sa capacité à inhiber la transcription de l'AdMLP utilisé comme matrice de transcription. La présence d'ADN endommagé inhibe ainsi la production du transcrit de 309 nucléotides (Fig 3B), ce qui est en accord avec les observations précédentes et l'expérience montrant la fixation spécifique de TBP recombinant sur

membrane de nitrocellulose. On observe une inhibition proportionnelle à la quantité d'ADN endommagé présente dans le milieu réactionnel et donc à la quantité des lésions dues aux UV (comparer les colonnes 2-5 avec les colonnes 6-9 et 10-13) ou dues au cisplatine (Fig 3D) (comparaison des 5 colonnes 2 et 3 avec les colonnes 4 et 5), ce qui démontre que la capacité de l'ADN endommagé à inhiber la transcription d'un second ADN est fonction du nombre de lésions. Dans cet exemple, la sonde d'ADN utilisée en tant que compétiteur est un fragment de restriction Pvul de pSK de 1084 pb, traité (CP(+)) ou non (CP(-)) au cisplatine. Le TBP reconnaît également de façon 10 spécifique l'ADN endommagé par le cisplatine, ce qui est démontré par le test de fixation sur membrane de nitrocellulose (voir exemple 3 ci-après) (Fig 3C). Il est possible de rétablir complètement la transcription après ajout supplémentaire de TBP (Fig 3D, colonnes 6 et 7).

15 EXEMPLE 3 : Fixation sur membrane de nitrocellulose standard (Fig 3A, C et E).

On met à incuber du TBP recombinant avec de l'ADN marqué au phosphore 32, endommagé par traitement soit par le cisplatine (Fig 3C), 20 soit par irradiation UV (Fig 3A). L'interaction TBP/ADN est déterminée par la capacité du TBP recombinant à retenir l'ADN sur une membrane de nitrocellulose. Les Figures 3A et 3C illustrent ce résultat en montrant le pourcentage d'ADN retenu sur les filtres de nitrocellulose en fonction de la quantité de TBP pour un fragment F879 ayant été irradié à différentes 25 doses d'UV et pour le plasmide pSK traité au cisplatine. La quantification est réalisée en utilisant un analyseur phosphoimage. 100 % représente l'ensemble de la radioactivité contenue dans 1 μ l de chaque sonde d'ADN.

30 La Figure 3C diffère de la figure 3A seulement en ce que, en tant que sonde d'ADN, on utilise un fragment de restriction Pvul de 1084 pb de pSK traité (CP(+)) ou non (CP(-)) avec le cisplatine.

L'irradiation aux UV du fragment d'ADN F879 marqué au ^{32}P à des taux d'irradiation croissants (100, 500, 1000 ou 1500 J/m^2) a pour effet une augmentation correspondante de la quantité d'ADN retenue sur les filtres pour une concentration donnée de TBP. La capacité du TBP à retenir l'ADN de façon proportionnelle à la quantité de lésions contenues dans cet ADN suggère une affinité spécifique de TBP pour l'ADN endommagé par rapport à l'ADN non endommagé. Le fragment F879 ne contenant pas de séquence TATA susceptible de concurrencer la liaison du TBP, la fixation de TBP sur ce fragment peut être directement imputée à l'existence d'un dommage.

10

La Figure 3E rend compte de la fixation de TBP sur l'ADN pSK linéaire (EcoRI), non endommagé (AAF-) ou endommagé (AAF+) par l'acétylaminofluorène, sur membrane de nitrocellulose. La quantification est réalisée comme précédemment.

15

EXEMPLE 4 : Migration sur gel d'acrylamide (Fig 4).

La capacité de TBP purifié à se lier à l'ADN endommagé a été également observée dans des tests de variation de mobilité électrophorétique en utilisant la technique EMSA. Pour cela, on met à incuber une sonde d'ADN (36 mer, 0,5 ng, 10.000 cpm) marquée au phosphore 32 non-endommagé ou ne contenant qu'un seul site cisplatine (1,3-GpTpG) avec du TBP recombinant et dans ce second cas, on détecte la formation d'un complexe ayant une mobilité électrophorétique réduite par rapport à la sonde libre sur des gels d'acrylamide. En accord avec les tests de fixation sur membrane, la technique EMSA a mis en évidence la formation d'un complexe nucléoprotéique TBP/ADN endommagé. En présence de TBP, une quantité nettement plus importante de l'échantillon d'ADN endommagé est complexée par rapport à celle lorsque l'échantillon n'est pas endommagé (Fig 4, comparer les colonnes 2 et 12). En outre, on constate que la formation d'un complexe TBP/ADN endommagé est réduite de façon significative lorsque l'on ajoute des quantités croissantes de compétiteur (respectivement 10 et 50 ng) d'un fragment AdMLP de 64 mer contenant une séquence TATA (TATA : colonnes 5 et 6) ou d'un fragment

d'ADN Pvul pSK endommagé par le cisplatine (respectivement 10 et 50 ng) (CP ; colonnes 7 et 8) non marqué par rapport à un fragment non endommagé (comparer avec les colonnes 9 et 10). Le fait que l'addition d'un fragment contenant une séquence TATA (TATA) entre en compétition 5 avec l'ADN endommagé par le cisplatine pour l'association avec du TBP (voir la colonne 2 comparée aux colonnes 5 et 6), soutient la conclusion que l'échantillon déplacé correspond à un complexe TBP/ADN.

10 L'ensemble des résultats démontre clairement pour la première fois que deux types de lésions d'ADN, induites soit par irradiation aux UV, soit par traitement au cisplatine, servent de cibles pour la liaison de TBP. La fixation de TBP est fonction du nombre de lésions présentes dans l'ADN et semble suffisamment forte pour persister en présence de quantités significatives de la séquence TATA. L'inhibition de la transcription et la 15 rétention préférentielle de TBP sur une membrane de nitrocellulose ont été également observées avec un ADN endommagé à l'acétylaminofluorène (AFF) une amine aromatique connue pour ses capacités carcinogènes.

BIBLIOGRAPHIE

Aboussekhra, A.M., Biggerstaff, M.K.K., Shivji, J.A., Vilpo, V., Moncollin, V.N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J-M. Egly, and R.D. Wood. (1995).

5 Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80:859-868.

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112: 535-542.

Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., Hanawalt, P.C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* voi 40: 359-369.

Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A, Guarente, L (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system.

15 20 *Nature* 334(6177): 3742

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L, Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase 11. *Cell* 56(4): 549-61

25 Calsou, P and Salles, B. (1994). Properties of damage-dependent DNA incision by nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 22(23): 493742

30 Cavallini, B., Huet, J., Plassat, J.L, Sentenac, A., Egly, J.M., Chambon, P. (1988). A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor. *Nature* 334 (6177): 7780.

Chasman, D. I., Flaherty, K. M., Sharp, P. A., and Kornberg, R. D. (1993). Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8174-8178.

5 Coleman, R.A., Pugh, B.F. (1995). Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA. *J Biol Chem* 270(23): 13850-13859.

10 Davison, B.L., Egly, J.M., Muivihill ER, Chambon P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 301: 680-686.

15 Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994). Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase 11. *Nature* 368:769-772.

Evans, S. V. (1993). SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J. Mol. Graphics* 11: 134-138.

20 Feaver W.J, J.Q. Svejstrup, L. Bardwell, A.J. Bardwell, S. Buratowski, K.D. Gulyas, T.F. Donahue, E.C. Friedberg, and R.D. Kornberg. (1993). Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* 75:1379-1387.

25 Friedberg, E.C. (1996). Relationships between DNA repair and transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 15 - 42.

30 Gérard, M., L Fischer, V. Moncollin, J-M. Chipoulet, P. Chambon, and J-M. Egly. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* 266:20940-20945.

Hahn, S., Buratowsky, S., Sharp, P.A., Guarente, L. (1989). Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 5718-5722.

5 Hanawalt, P.C. (1994). Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 266(5193): 1957-1958.

Hansson, J., and Wood, R.D. (1989). Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis- and trans-diammine dichloro platinum(II). *Nucleic Acids Res* 17(20): 8073-8091.

10 Hoeijmakers J.H.J., Egly J-M. and Vermeulen W. (1996), TFIIH: a key component in multiple DNA transactions. *Curr. OP; Gen & Dev*, 6, 26-33.

15 Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A47*: 110-119.

20 Juo, Z. S., Chiu, T. K., Leiberman, P. M., Baikalov, I., Berk, A. J., and Dickerson, R. E. (1996). How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.* 261: 239-254.

25 Kim, J. L., Nikolov, D. B., and Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365: 520-527.

Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S., and Sigler, P. B. (1993). Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365: 512-520.

30 Maldonado E; Ha I; Cortes P; Weis L; Reinberg D. (1990). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Mol Cell Biol* 10(12): p63356347.

Mayne, L.V., and A.R. Lehmann. 1982. Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* 42:1473-1478.

5 Moggs, J.G, Yarema, K.J, Essigmann, J.M, Wood, R.D. (1996). Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem* 271(12): 7177-86

10 Moncollin, V, Roy R.D.W, and Egly, J.M. (1994). The TATA saga: Structure and function of the TATA-binding factor in "Transcription: Mechanism and regulation". Raven Press Ltd. New York.

15 Mu, D., C-H. Park, T. Matsunaga, D.S. Hsu, J.T. Reardon, and A. Sancar. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J. Biol. Chem.* 10:2415-2418.

20 Nakajima N; Horikoshi M; Roeder RG. (1988). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase 11: purification, genetic specificity, and TATA boxpromoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol* 8(10): p4028-40.

25 Neidle, S. (1994). In "DNA structure and recognition", S. Neidle Ed., IRL Press, p 101.

Nicholls, A. (1993). GRASP: Graphical representation and analysis of surface properties. New York: Columbia University.

30 Nikolov, D.B, Chen, H, Halay, E.D, Usheva A.A, Hisatake K, Lee D.K, Roeder RG, Burley SK. (1995). Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377(6545):119-128.

Oosterwijk, M.F., Versteeg, A., Frilon, R., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F. (1996). The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA-damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes. *Mol. Cell Biol.*, 16: 4436 - 4444.

5

Schaeffer, L., R. Roy, S. Humbert, V. Moncollin, W. Vermeulen, J.H.J. Hoeijmakers, P. Chambon, and J-M. Egly. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIP) basic transcription factor. *Science* 260:58-63.

10 Svejstrup, J.C, Vichi, P. and Egyi, J.M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIP. *Trends in Bioch. Sci.* 21 (249): 346-350.

15 Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., and Lippard, S. J. (1995). Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377: 649-652.

20 Troelstra, C., A. van Gool, J. de Wit, W. Vermeulen, D. Bootsma, and J. H.J. Hoeijmakers. 1992. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicase, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71 :939-953.

25 Vassilyev, D. G., Kashiwagi, T., Mikami, Y., Ariyoshi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E., and Morikawa, K. (1995). Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition. *Cell* 83: 773-782.

30 Wang Z; Buratowski S; Svejstrup JQ; Feaver WJ; Wu X; Kornberg RD; Donahue TF; Friedberg EC. (1995). The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIP, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* 15(4) p2288-2293.

Zamble, D.B., Lippard, S.J. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 20(10): 435-439.

Zawel, L., K. P. Kumar, and D. Reinberg. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase 11 transcription. *Genes and Dev.* 9:1479-1490.

REVENDICATIONS

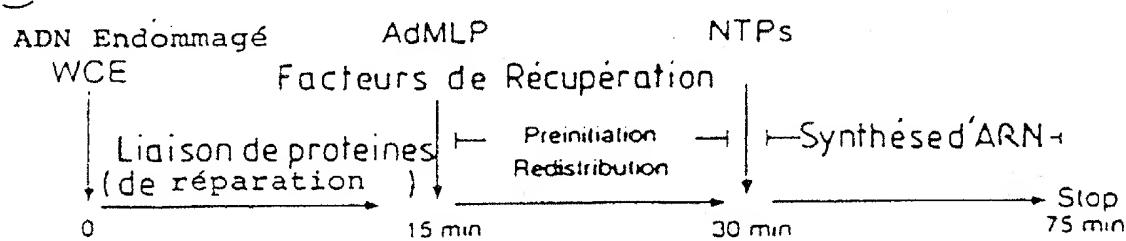
1. Procédé de mise en évidence et/ou de dosage d'ADN endommagé dans un échantillon, caractérisé en ce qu'on évalue l'importance de la fixation de TBP ou d'un produit analogue sur l'ADN de l'échantillon et on détermine les résultats directement ou par rapport à un témoin.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'importance de la fixation de TBP sur l'ADN est évaluée par détermination de la transcription d'un ADN non endommagé connu, dans des conditions permettant une transcription spécifique, la transcription n'étant assurée que par la présence dans ledit milieu de TBP résiduel non fixé sur l'ADN.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que :
 - 15 a) l'échantillon est mis en incubation dans un milieu contenant l'ensemble des composants nécessaires à la transcription spécifique dont TBP ou un produit analogue ;
 - b) après incubation, on ajoute à l'échantillon une séquence d'ADN non endommagé connu contenant un promoteur, dans des conditions assurant la transcription mais sans TBP additionnel ;
 - 20 c) on détermine la transcription de cet ADN connu et ;
 - d) on mesure la variation de transcription de cet ADN connu par rapport à une transcription normale ou par comparaison avec un témoin.
- 25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape a) est effectuée dans des conditions qui ne permettent pas la réparation de l'ADN.
5. Procédé selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée dans un milieu constitué d'extraits cellulaires totaux.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'extraits cellulaires HeLa.

7. Procédé selon 1 à 6 des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée dans un milieu de transcription reconstitué (RTS).
8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit échantillon 5 est mis en présence d'un réactif contenant du TBP ou un produit analogue et on évalue l'importance du dommage de l'ADN par mise en évidence et/ou dosage du complexe TBP/ADN formé directement ou par rapport à un témoin.
- 10 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la formation du complexe TBP/ADN est mise en évidence et/ou dosée par :
 - a) fixation dudit complexe sur un support ;
 - b) variation de la mobilité dudit complexe sur gel ;
 - c) empreinte à la DNase I.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que la formation dudit complexe est évaluée par la mesure de la quantité d'ADN retenue sur une membrane de nitrocellulose.
- 20 11. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que la formation dudit complexe est évaluée par la variation de mobilité du complexe sur un gel d'acrylamide.
- 25 12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'évaluation de la variation de mobilité est effectuée par la technique EMSA.
13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'on utilise du TBP sous forme libre.
- 30 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on utilise le complexe TFIID.
15. Application du procédé selon l'une des revendications 1 à 14 à la mise en évidence et/ou au criblage de produits cytotoxiques sur l'ADN.

16. Application selon la revendication 15 au criblage de produits anticancéreux.
17. Application du procédé suivant l'une des revendications 1 à 14 pour le 5 suivi thérapeutique d'un traitement anticancéreux.
18. Application du procédé selon l'une des revendications 1 à 14 à la mise en évidence et/ou au criblage de produits cytotoxiques sur l'ADN, caractérisée en ce qu'on fait réagir au préalable ledit produit dans 10 l'échantillon d'ADN non endommagé, ledit échantillon étant alors dépourvu de tout autre produit susceptible d'endommager l'ADN et la cytotoxicité du produit est établie lorsqu'on détecte de l'ADN endommagé.

1/4

(A)



(B)

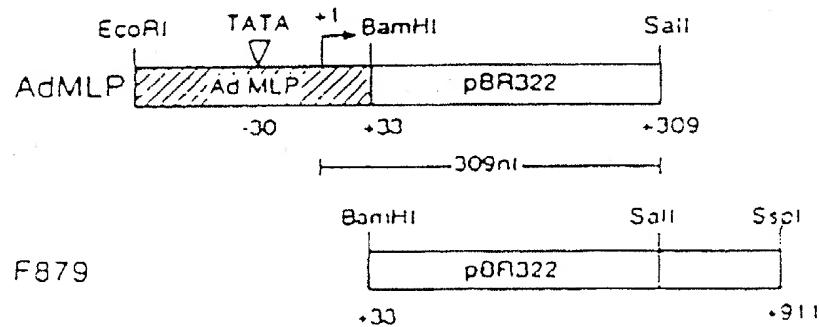
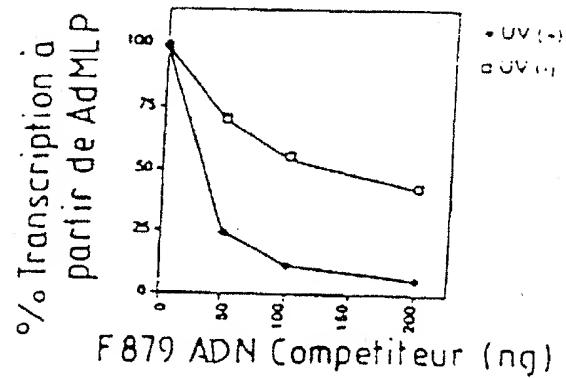
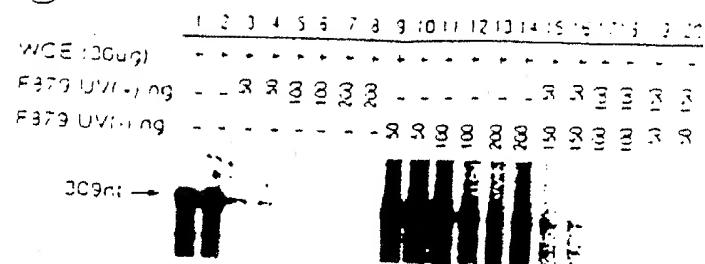


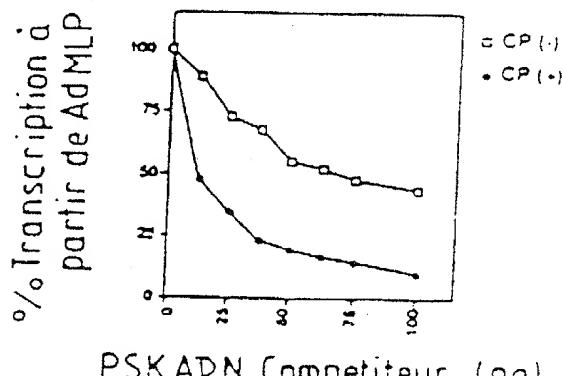
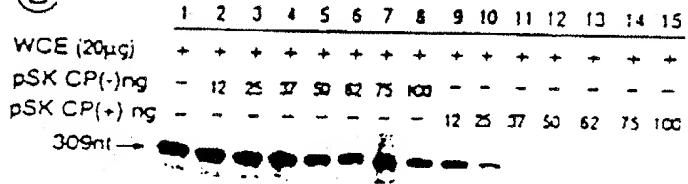
Fig. 1

2/4

(A)



(B)



(C)

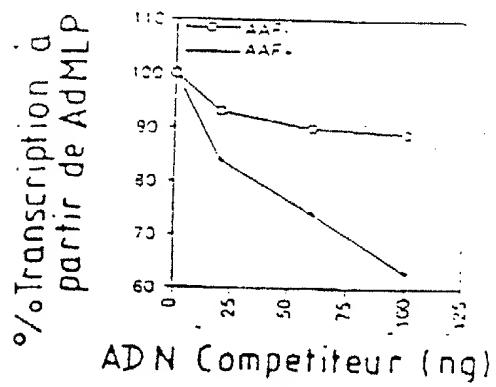


Fig. 2

3/4

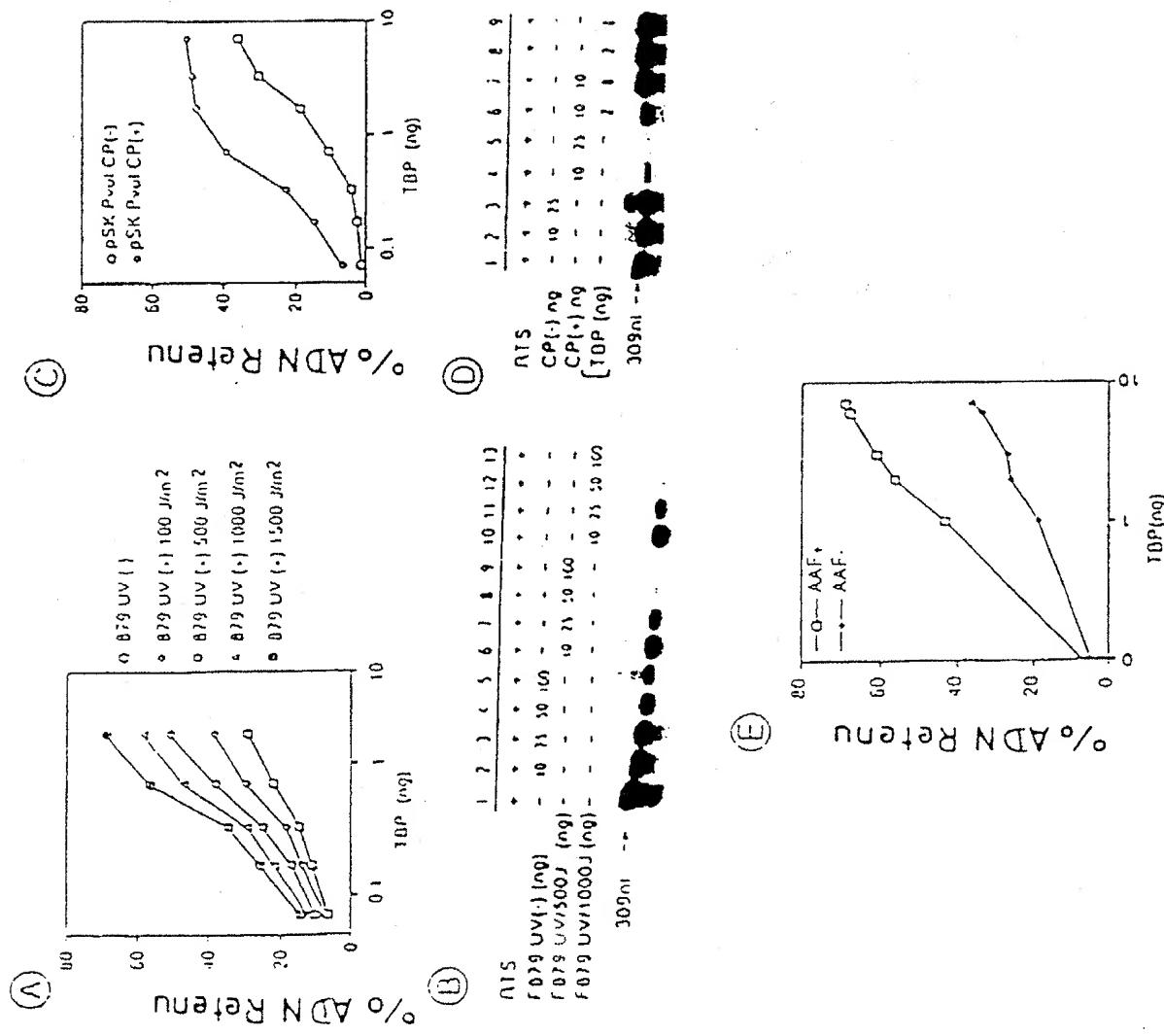


Fig. 3

4/4

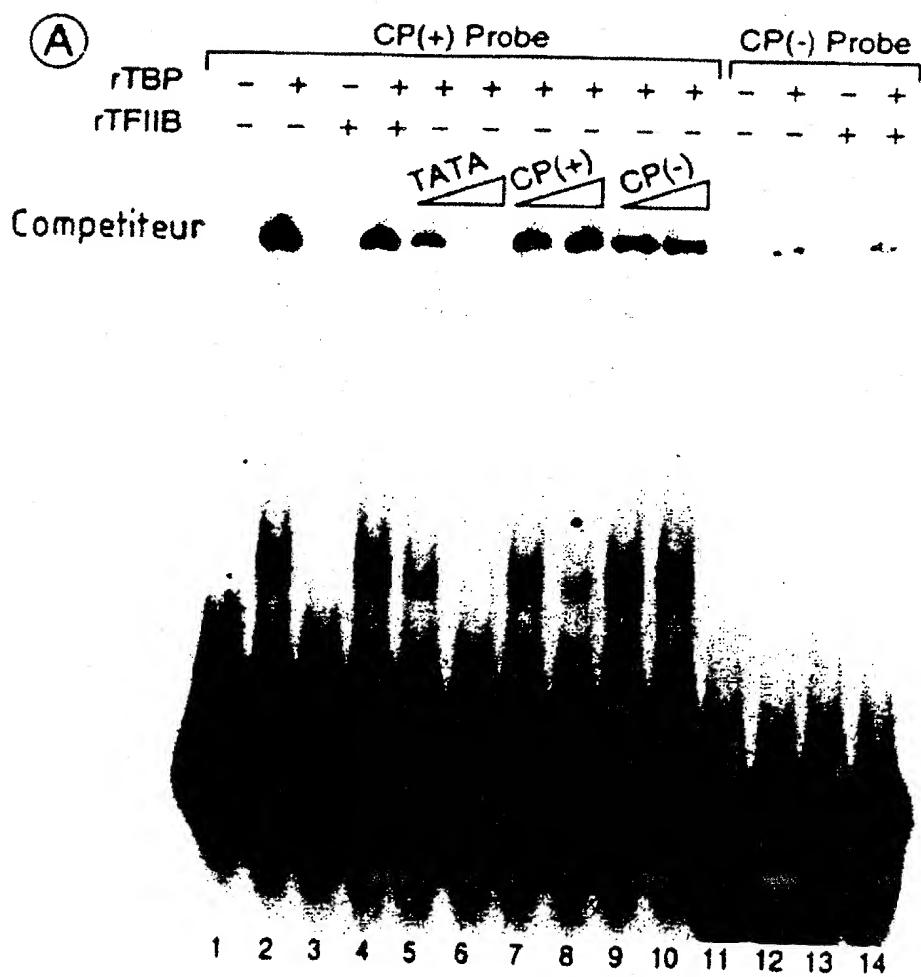


Fig. 4

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 539284
FR 9702093

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	FRIEDBERG: "RELATIONSHIPS BETWEEN DNA REPAIR AND TRANSCRIPTION" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, vol. 65, 1996, pages 15-42, XP002047711 * page 33 - page 34 * ---	1-18
A	HUMBERT ET AL.: "p44 AND p34 SUBUNITS OF THE BTF2/TFIIF TRANSCRIPTION FACTOR HAVE HOMOLOGIES WITH SSL1, A YEAST PROTEIN INVOLVED IN DNA REPAIR." EMBO J., vol. 13, no. 10, 1994, pages 2393-2398, XP002047712 * page 2396 *	1-18
A	ABOUSSEKHLA ET AL.: "MAMMALIAN DNA NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR RECONSTITUTED WITH PURIFIED PROTEIN COMPONENTS" CELL, vol. 80, 1995, pages 859-868, XP002047713 Page 860, "Reconstitution of NER Synthesis". ---	1-18 DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
A	SVEJSTRUP: "DIFFERENT FORMS OF TFIIF FOR TRANSCRIPTION AND DNA REPAIR: HOLO-TFIIF AND A NUCLEOTIDE EXCISION REPAIRSOME" CELL, vol. 80, 1995, pages 21-28, XP002047714 * page 26, colonne GAUCHE *	1-18
A	WO 96 28571 A (RECH INVESTISSEMENT SOC FR DE ; PROVOT CHRISTIAN (FR); SALLES BERNAR) * le document en entier * ---	1-18 C12Q
		-/-
1	Date d'achèvement de la recherche 21 novembre 1997	Examinateur Hagenmaier, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document interne/externe		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
nationalFA 539284
FR 9702093

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	<p>CALSOU AND SALLS: "PROPERTIES OF DAMAGE-DEPENDENT DNA INCISION BY NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IN HUMAN CELL-FREE EXTRACTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, 1994, pages 4937-4942, XP002047715 * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-18
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)		
1	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
	21 novembre 1997	Hagenmaier, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		